

## IDENTIFICACION DE UNA LEVADURA (*Lipomyces tetrasporus*) ASOCIADA A BACTERIAS DIAZOTROFAS DE SUELOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

G. M. FRONTERA y B. M. RAIMONDI

Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía UNLP. CC 31, La Plata 1900, Argentina.

Recibido: 20 de septiembre de 1989. Aceptado: 1 de agosto de 1990.

### RESUMEN

De un estudio sobre la presencia de especies bacterianas fijadoras de  $N_2$  de los géneros *Beijerinckia* y *Derxia* en suelos de la Prov. de Bs. As. se logró aislar e identificar una levadura capaz de desarrollar abundantemente en cultivos exentos de nitrógeno combinado. La misma fue clasificada como perteneciente a la subfamilia Lipomycetoidea, género *Lipomyces*, especie *tetrasporus*.

Palabras claves: *Lipomyces tetrasporus*, levadura, identificación, asociación, diazótrofos

### SUMMARY

## YEAST IDENTIFICATION (*Lipomyces tetrasporus*) ASSOCIATED WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA IN SOILS OF BUENOS AIRES (Argentina).

For this work we use information of a study about the presence of bacteria species which fix atmospheric nitrogen of the genera *Beijerinckia* and *Derxia* in soils of Buenos Aires. Thus, we could isolate and identify a yeast which had abundant growth in culture medium without combined nitrogen. The yeast was classified in the subfamily Lipomycetoidea, genus *Lipomyces*, species *tetrasporus*.

Key words: yeast, *lipomyces tetrasporus*, diazotrophic bacteria.

### INTRODUCCION

La presencia de levaduras en medios de cultivo exentos de nitrógeno combinado no es habitual, ni tampoco un hecho informado con cierta frecuencia. Sin embargo, existen algunos antecedentes, ya que la revisión realizada permitió extraer las siguientes citas: 1) Starkey (1946), durante un estudio de fijación de  $N_2$  por microorganismos del suelo encontró colonias de levaduras mucosas culturalmente similares a las de *Azotobacter* en suelos cultivados con citrus. Este aislamiento y posterior estudio fue incorporado por Lodder et al. (1952) como *Lipomyces starkeyi*,

2) Becking, estudiando el género *Azotobacter* en suelos de Trinidad Tobago y luego Dommergues en Nigeria lograron identificar este género de levaduras en medios de cultivo libres de nitrógeno combinado, según cita de Lodder J. (1970) como *Lipomyces kononenkoae*.

Probablemente la poca información existente debiera atribuirse a la similitud entre las características culturales de ambos microorganismos, pasando desapercibida la presencia de esta levadura. Frontera et al (1983) en un estudio sobre la presencia de especies bacterianas fijadoras de  $N_2$  de los géneros *Beijerinckia* y *Derxia* en suelos de la Prov. de Bs. As. lograron aislar e

identificar una levadura capaz de desarrollar abundantemente en medios de cultivo exentos de nitrógeno combinado. La misma se clasificó como perteneciente al género *Lipomyces*, según el Manual de Lodder y Kreger van Rij (1970) posteriormente el mismo autor (comunicación personal) comprobó por medio de cromatografía en fase gaseosa la formación del típico pico de etileno por reducción de acetileno inyectado. Sin embargo, el análisis posterior de las muestras mostraron la presencia de bacterias libres asociadas a la levadura a pesar de las extremas precauciones ensayadas para mantener los cultivos puros. La hipótesis que actualmente se investiga es la de presumir un mecanismo de endosimbiosis mutualista que se transforma en una asociación sinérgica al romperse algunas células levaduriformes. Existe alguna información bibliográfica respecto de la fijación de nitrógeno por medio de algunas levaduras, aunque los autores han propuesto un mecanismo similar a los de los oligonitrófilos (Waksman, 1932).

Este trabajo tuvo por objetivo principal la identificación de una levadura asociada a bacterias diazótrofes.

## MATERIALES Y METODOS

Las muestras de suelo estudiadas fueron provenientes de las localidades de Azul (Brunizen con B textural) Balcarce (Brunizen con B textural) Barker (Brunizen con B textural) Ramallo (Argiudol típico) Carmen de Areco (Argiudol típico) Gral. Belgrano (Hapludol thaptoárgico) González Cacán (Argiudol típico) Rojas (Argiudol típico) y San Nicolás (Argiudol vértico).

Las muestras que fueron el resultado de la mezcla de 4 subtomos del potrero elegido (aproximadamente 500 g.) se depositaron en bolsas de polietileno hasta su llegada al laboratorio. En éste se dejaron estabilizar durante 15 días desparramándoselas en bandejas de plástico en cámaras aisladas del ambiente.

En los suelos de Rojas y San Nicolás hubo desarrollo positivo de la levadura. Para el aisla-

miento y posterior identificación se siguió la técnica de incubación de suelos, agregando como sustancias energéticas sacarosa al 1,5% y lactosa al 1,5%. Se llevó el suelo al 70% de su capacidad de retención con agua esterilizada. Las muestras se incubaron en una estufa a 28°C y a partir de los 7 días y hasta los 15 días se extrajeron alícuotas de las mismas.

Los análisis microbiológicos de aislamiento se realizaron siguiendo el método de la sobrecapa en sílico-gel de Amor Asunción (1965). Las diluciones de suelo sembradas fueron hasta  $10^{-6}$ /0,5 ml. y las levaduras fueron encontradas en la dilución  $10^{-4}$ /0,5 ml. De los aislamientos realizados se purificaron las colonias en el medio de Jensen modificado por Frontera (1983). La identificación se hizo según las características culturales morfológicas y fisiológicas recomendadas por los Manuales de Lodder et al (1970) y de Kreger van Rij (1984).

Para el ensayo de fijación de nitrógeno se utilizaron cultivos puros de la levadura en medios de cultivo líquidos y agarizados de Jensen (1960) y de Jensen modificado por Frontera (1983). Los materiales fueron puestos bajo una atmósfera libre de gases amoniacales; para ello se usó una campana de vidrio asentada sobre una base de vidrio sellada con "plastilina" y conectada a una bomba de vacío alimentándose con aire previamente pasado por una solución de ácido sulfúrico 1 N. Después de una semana se cambiaron los tapones de algodón de los envases donde crecían los microorganismos por otros de goma esterilizados y sellados con tapitas de aluminio (similares a las de los envases de antibióticos) para inyectar acetileno. El método de inyección de acetileno y determinación luego de etileno se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer según la técnica de Amor Asunción (1977) como evidencia de fijación de nitrógeno molecular.

La prueba de asimilación de hidratos de carbono se ensayó en el medio de Wickerham y Burton (1948) modificando el agregado de vitaminas por gotas de agua de levadura. Se sembró en profundidad, posteriormente se agregó el medio

de cultivo y se dividieron las placas de Petri por medio de la técnica del auxonograma. En cada sector se hizo un toque con cada hidrato de carbono a ensayar, ellos fueron: glucosa, galactosa, sorbosa, maltosa, sacarosa, etanol, melibiosa, rafinosa, almidón, D manitol, D xilosa y lactosa.

La asimilación de nitratos se llevó a cabo en un medio mineral agarizado y compuesto por: glucosa 2%, fosfato monopotásico 0,1%, sulfato de magnesio x 7 de agua 0.05%, agar 2%, nitrato de potasio 0,78% y agua destilada 1 l.

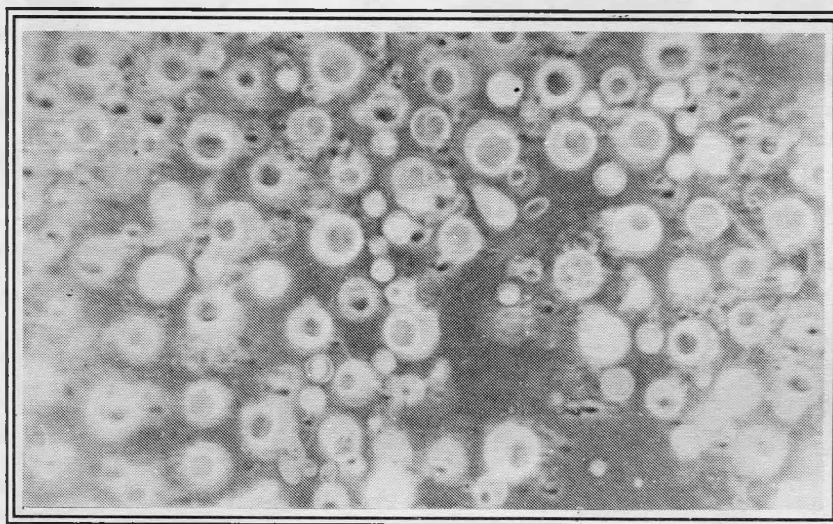


Foto 1: Observación de células de levaduras con glóbulo lipídico ocupando casi todo el volumen celular (600 x).  
Observation of yeast cells with lipidic globules wich accupy almost all the celular volume (600 x).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Características morfológicas: en el medio de agar mosto de malta las colonias desarrollaron abundantes colonias ambarinas cremosas y convexas a los 7 días en temperaturas de incubación de 28° C.

Los preparados microscópicos con 600 aumentos mostraron células esféricas de 4,7 a 11 mm de diámetro, cuerpos lipídicos por lo general central y grandes, hasta ocupar casi todo el

volúmen celular (Fig. 1) en algunas levaduras hasta 2 o 3 glóbulos lipídicos grandes. La coloración del cuerpo lipídico se realizó con Sudan Black B. La presencia de cápsulas fue positiva ante una coloración en negativo con nigrosina.

Se observó que la reproducción asexual es por gemación multilateral en la mayoría de las células (Fig. 2). Sexualmente la reproducción es por ascosporas y lo más frecuente fue la presencia de 4 por asca. También fue distinguible la unión del asca a la célula madre que a su vez podía estar gemando. El estudio de esporulación fue por la técnica de coloración con verde de

malaquita y por microscopía electrónica de barrido (Fig. 2).

Las esporas comenzaron a aparecer a las 72 h. cuando se las cultivó en un medio deficiente en nitrógeno. Para esta prueba se usaron cultivos en estría de 1 mes de desarrollo, colocándose una ansada en 5 ml. de agua destilada y estéril, de esta forma ya fue posible observar detalles de la esporulación a las 24 h.

La clasificación de la especie como perteneciente al género *Lipomyces* se resolvió sin lugar a dudas por la presencia de estrias longitudinales en las esporas (Fig. 3).

Las características fisiológicas observadas fueron: poseen metabolismo solamente oxidativo, no se han puesto de manifiesto productos de fermentación cuando se utilizaron los azúcares ensayados en medios de cultivo para fermentación con campanita de durhan. La oxidación fue positiva para los siguientes azúcares: glucosa,

Foto 2: Se observa gemación múltiple y también algunos tubos de germinación conteniendo ascosporas en número variable (600 x).

Observation of multilateral budding and some germinations tubes containing ascospores in variable number (600 x).

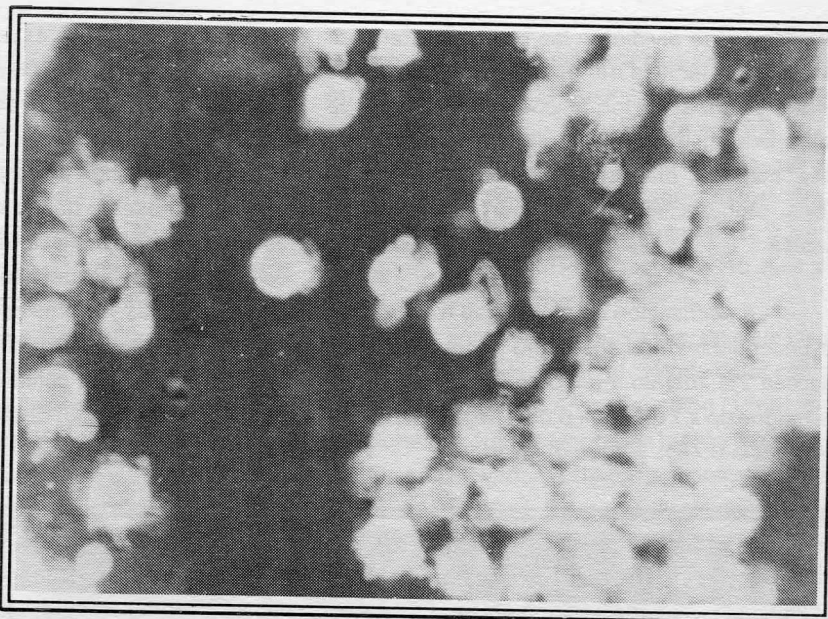
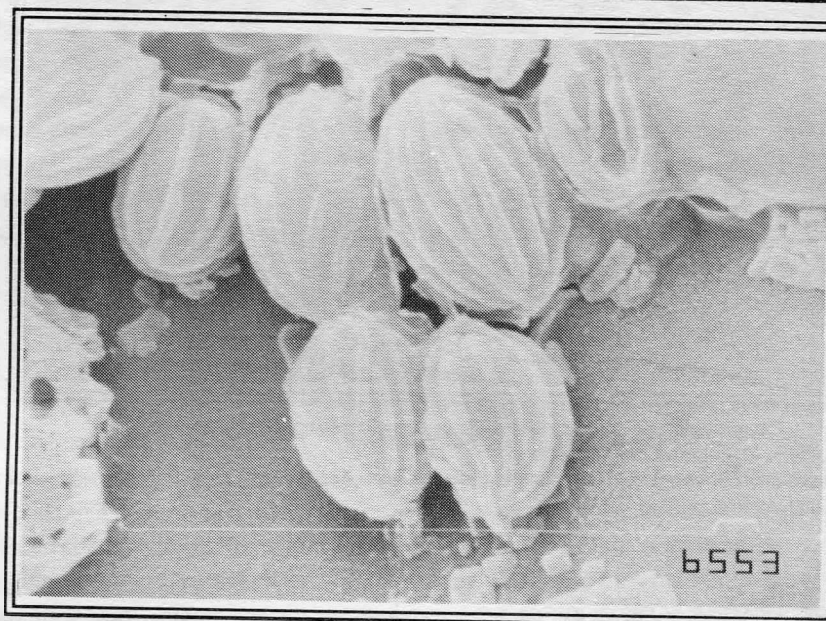


Foto 3: Observación de típicas estrías longitudinales de *Lipomyces tetrasporus* (7500 x).

Observation of the typical lengthwise ridges of *Lipomyces tetrasporus* (7500 x).



galactosa, sorbosa, maltosa, sacarosa, etanol, melibiosa, rafinosa, almidón, D manitol, D xilosa. Solamente la prueba de asimilación oxidativa fue negativa para la lactosa. La prueba de asimilación de nitratos fue negativa, no hubo desarrollo cuando creció con esta única fuente de nitrógeno.

El abundante desarrollo obtenido en medios de cultivo exentos de nitrógeno combinado y la formación de etileno a partir de acetileno indicaría que es posible que en esta especie funcione

un mecanismo de endosimbiosis mutualista ya que los manuales de clasificación microbiológica en sus últimas ediciones consideran factible esta asociación. La prueba de cromatografía en fase gaseosa es la vía más adecuada para confirmar este hecho. Se hace necesario, en primer lugar, separar ambos simbiontes y en segundo lugar verificar la presencia del endosimbionte dentro del cuerpo celular de la levadura identificada. Esto puede lograrse por microscopía electrónica de



transmisión. Esta hipótesis será objeto de próximas investigaciones.

## CONCLUSION

La levadura encontrada asociada a bacterias diazotrofas de los suelos fue clasificada como *Lipomyces tetrasporus*. Las características ensa-

yadas corresponden a las descritas en los manuales consultados. El detalle sobresaliente y definitorio es la formación de estrías longitudinales o arrugas en las esporas, situación que no se describe en las restantes especies y que es usada por Kreger van Rij (1984) como característica taxonómica fundamental para ubicar la especie.

## BIBLIOGRAFIA

- Amor Asunción, M.J. Determinación de *Azotobacter* en cajas de sílico gel sin secado. *Ciencia e Investigación* 21: 368-370 (1965).
- Amor Asunción, M.J. Soriano S., Cusato, M., Frontera, G.M. y Gonzales, P. Influencia de la descomposición anaerobia de la paja de maíz sobre el desarrollo de *Azotobacter* y *Beijerinckia*. *Ciencia e Investigación* 33: 409-412 (1977).
- Frontera, G.M. Un medio de cultivo exento de nitrógeno combinado para el desarrollo de diferentes especies bacterianas fijadoras de N<sub>2</sub>. *Rev. Fac. Agr. de Bs. As.* 4: 15-18 (1983).
- Frontera, G.M., Lett, L., Bruno, S. y Bruno, M. Aislamiento e identificación de especies bacterianas de los géneros *Beijerinckia* y *Dexia* en suelos de la Prov. de Bs. As. *Actas X Congreso Argentino y VII Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. Mar del Plata, Argentina (1983).
- Jensen, A., Petersen, E.J., De, P.K. and Bhattacharia, R.A. A new nitrogen fixing bacterium: *Dexia gummosa*, nov. gen. nov. spes. *Arch. Für Mikrobiol.* 36: 182-195 (1960).
- Waksman, A.S. Principles of soil microbiology. Second Edition. The Williams & Williams Company, Baltimore. 252-253 (1932).
- Kreger, van Rij, N.W. The yeast a taxonomic study. Elsevier Sciences publishers B. V. Amsterdam 252-262 (1984).
- Lodder, J. General classification of the yeast. In: J. Lodder (Ed). The yeast, a taxonomic study. North Holland Publ. co. Amsterdam (1952).
- Lodder, J., and Kreger van Rij, N.W. The yeast, a taxonomic study. North Holland Publ. co, Amsterdam, 379-402 (1970).
- Nieuwdrorp, P. J., P. Bos & Sloff, W. Ch. Antoine van Leeuwenhoeck, 36: 182-195 (1970).
- Starkey, R.L. Lipidic production by soil yeast. *J. Bacteriology* 51, 33-50 (1946).
- Wickerham, L. J. and Burton, K.A. Taxonomic of yeast, techniques of classification. *J. Bacteriology* 56: 363 (1948).

## AGRADECIMIENTOS

A la Lic. L. C. Lett y a las Ing. Agr. Susana y Marta Bruno por la colaboración prestada en el presente trabajo.